

Les composés phénoliques dans la résistance des pommes à l'infection par les *Pezicula malicorticis* et *P. alba*

G. BOMPEIX et J.-F. BOUSQUET*

LES COMPOSÉS PHÉNOLIQUES DANS LA RÉSISTANCE
DES POMMES À L'INFECTION PAR LES
PEZICULA MALICORTICIS ET *P. ALBA*

G. BOMPEIX et J.-F. BOUSQUET

Fruits, Oct. 1974, vol. 29, n°10, p. 693-696.

RESUME - Les phénols totaux, l'acide chlorogénique, les catéchines, les leucoanthocyanines, diminuent notablement dans la peau des fruits au cours de leur conservation, mais évoluent d'une manière similaire dans l'air et en atmosphère contrôlée (AC). Cependant le pH est nettement plus bas dans ce dernier cas. Il existe trois phases essentielles dans la résistance des pommes à l'infection. Dans la première, la teneur en composés phénoliques est déterminante en présence d'un bas pH, notamment les leucoanthocyanines et dans une moindre mesure l'acide chlorogénique. Dans la seconde, l'acidité ionique additionne ses effets, et explique l'évolution pathogénique différente dans l'air et en AC. Dans la troisième, il y a un effondrement des facteurs de résistance précités, ainsi qu'une sensibilité maximale des parois à la lyse enzymatique.

Dans un petit nombre de cas les parasites sont inhibés *in vitro* par des concentrations en composés phénoliques voisines ou inférieures à celles des tissus de plantes susceptibles d'être infectées. L'efficacité de ces composés comme inhibiteurs, peut rendre compte de la résistance des tissus, d'autant plus que la teneur en composés phénoliques peut augmenter à la suite de l'infection (phytoalexines) (6, 7, 14).

Cependant dans le cas des fruits la mise en évidence d'inhibiteurs préexistants ou phytoncides, n'a pas encore été suffisamment précisée.

Nous avons pu observer l'inhibition du développement des pourritures à *Pezicula* spp. sur les pommes, par action d'une atmosphère contrôlée (AC) soit, 5 p. cent CO₂, 3 p. O₂, 92 p. cent N₂, par rapport à l'air, sans modification notable de la vitesse de croissance *in vitro* ou *in vivo* (3). En outre, divers auteurs (9, 11) ont noté une diminution

sensible de la teneur en quelques composés phénoliques lors de la conservation des fruits dans l'air.

Nous avons alors supposés qu'en AC les teneurs de la peau des fruits en phénols sont maintenues à des valeurs plus élevées, ce qui pourrait expliquer le ralentissement ou même l'arrêt du développement pathogénique dans ces conditions. C'est pourquoi nous essayons de comparer l'évolution biochimique des fruits et le développement de la maladie dans les deux types d'atmosphère, air et AC.

MATÉRIEL ET TECHNIQUES

Au total 1.300 pommes «Golden delicious» ont été utilisées. Pour chaque type de conservation (air 0,5°, AC 1,5°) on a inoculé le 24 novembre 1972, 200 fruits par le *P. alba* et 200 par le *P. malicorticis* avec des homogénats de mycélium (3). 150 fruits servent de témoins et aucun parasite ne s'y développera, 100 autres fruits sont destinés à la réalisation des dosages chimiques. Le pH du jus des fruits est aussi mesuré, et une épreuve de dureté des tissus

* - Laboratoire de Pathologie végétale, Institut national agronomique
16, rue Claude Bernard - 75231 PARIS Cedex 05
Centre national de Recherches agronomiques
route de Saint-Cyr - 78000 VERSAILLES.

est effectuée le 12 mars, date habituelle d'apparition des pourritures, avec le pénétromètre type «Bellevue». 50 mesures sont pratiquées sur dix fruits dans chaque condition d'atmosphère.

L'analyse de l'évolution pathogénique est effectuée suivant une méthode éprouvée : pourcentage de fruits malades, nombre de contaminations pour 100 fruits quelconques (C 100) ou de ceux qui sont atteints (C*100), fréquence des lésions par fruits et de leurs dimensions rangées par classes de 5 mm.

Chaque analyse chimique est réalisée à partir de 20 g de pelures fines prélevées dans la zone équatoriale des pommes. Après broyage au «Turmix» dans de l'éthanol refroidi à -40°, puis filtration sous vide, la solution éthanolique est évaporée à sec à une température voisine de 30°C. Le résidu est repris par 40 ml d'eau distillée et épuisé, trois fois, par de l'éther de pétrole pour éliminer les chlorophylles et les corps lipidiques. La fraction aqueuse est fractionnée quantitativement contre l'acétate d'éthyle, cinq fois, par demi-volume. La phase organique est évaporée à sec et reprise précisément par 10 ml d'éthanol à 95°.

2 ml de cette solution sont réservés pour le dosage de l'acide chlorogénique par chromatographie descendante sur papier. Les quantités adéquates de la solution éthanolique sont déposées sur papier Whatman n°3, le solvant de migration est le butanol/acide acétique/eau, 4/1/5. Après migration durant une nuit, la tache d'acide chlorogénique est repérée sous UV par sa couleur vert-jaune au Rf 0,55. La tache est incluse dans un carré de 5 x 3 cm qui est découpé et élué dans 5 ml d'éthanol avec agitation pendant une heure. La lecture est faite au spectrophotomètre à 328 mμ. Le blanc est réalisé dans les mêmes conditions sur un carré de papier non chargé. Des mesures témoins sont réalisées avec l'acide-phénol pur (NBC).

La solution éthanolique restante (8 ml) est évaporée et reprise par 16 ml d'eau malgré une solubilisation difficile. Des dilutions sont réalisées pour le dosage des phénols totaux, des catéchines et des leucoanthocyanines.

Le dosage des phénols totaux est réalisé avec le réactif de Folin-Denis, technique modifiée par SWAIN et HILLIS (13) ; la courbe étalon est réalisée avec du pyrocathécol.

Le dosage des leucoanthocyanines est basé sur le principe que, chauffées en milieu acide, elles sont transformées quantitativement en anthocyanes reconnaissables et dosables grâce à leur coloration rouge (12). A une prise d'échantillon de 1 ml sont ajoutés 4 ml de réactif. La DO est mesurée au spectrophotomètre à 550 mμ. Le blanc est identique mais il n'est pas chauffé. Dans les résultats les quantités de leucoanthocyanines sont exprimées en valeurs arbitraires.

Le dosage des catéchines utilise la réaction colorée de la vanilline avec ces composés en milieu acide (12). 4 ml de réactif sont ajoutés à une prise d'essai de 1 ml très lentement, à une température inférieure à 35°C. Après 15 mn à la température ambiante, la DO (DO1) est mesurée à 500 mμ. Le blanc correspond à 4 ml d'H₂SO₄ et 1 ml d'H₂O. Cependant deux corrections sont apportées à la valeur obtenue. La première tient compte de l'évolution

de la solution à doser en milieu acide. Cette DO₂ est mesurée dans les mêmes conditions sur une prise de 1 ml et 4 ml d'acide sulfurique (10 p. cent v/v). L'autre correction porte sur la DO propre du réactif (DO₃) et correspond à celle d'une prise de 1 ml d'eau et 4 ml de réactif. La valeur exacte de la réaction avec la vanilline est finalement : $DO = DO_1 - (DO_2 + DO_3)$. La courbe étalon est réalisée avec de la +catéchine.

RÉSULTATS

Comme l'indique le tableau 1, le phénomène latent semble beaucoup mieux vérifié pour le *P. alba* que pour le *P. malicorticis*. Pour la première espèce il y a en effet près de quatre fois plus de fruits malades et sept fois plus de contamination dans l'air que dans l'AC.

L'examen du tableau 1 laisse croire que seul le *P. alba* est un parasite latent. En réalité l'étude cinétique de la maladie (tableau 2) montre un retard considérable du développement des lésions pour les deux parasites. En effet pour le *P. malicorticis* le nombre de lésions d'une taille supérieure à 15 mm est largement plus élevé dans l'air qu'en AC. Cependant le nombre considérable de petites lésions en AC pourrait être attribué à la température légèrement supérieure et à l'humidité plus forte dans ces conditions au moment où la résistance biochimique des fruits devient équivalente dans les deux atmosphères pour le seul *P. malicorticis*.

Compte tenu des vitesses de croissance des deux parasites dans les mêmes conditions (3), il semble qu'aucune lésion ne se soit développée avant le début du mois de février. Le développement de la maladie avec le *P. alba* est dans les deux atmosphères, très nettement plus lent.

L'évolution biochimique des fruits dans le même temps, fait apparaître contrairement à notre attente des changements de la teneur en composés phénoliques, tout à fait similaires dans l'air et en AC (tableau 3).

Le taux d'humidité dans la peau des fruits est en fin de conservation de 76,36 p. cent en AC et de 76,84 p. cent dans l'air, enfin de 77,04 p. cent pour des fruits portant de nombreuses lésions. La chair des fruits sains contient 83,50 p. cent d'eau, tandis que la chair parasitée n'en contient que 81,40 p. cent (étuve 80°C, 24 h). Les faibles variations de la teneur en eau justifient ainsi le report des teneurs au poids frais.

Une mesure effectuée avec le pénétromètre type «Bellevue» montre pour les deux atmosphères des valeurs très voisines : 2,118 kg en AC et 2,098 kg dans l'air. La résistance mécanique des tissus à la pénétration n'intervient donc pas dans le phénomène examiné.

Le pH a été également mesuré, les valeurs sont les suivantes : le 24 novembre 3,2 (air), 3,3 (AC) - le 12 mars 3,65 (AC), 3,90 (air) - le 1^{er} avril 3,65 (AC), 4,0 (air) - le 3 mai 3,85 (AC), 4,00 (air) - le 29 juin 4,03 (AC), 4,15 (air). Sur des fruits très atteints par la maladie le pH peut être de 4,3 à 4,5.

TABLEAU 1 - Évolution pathogénique comparée des fruits conservés dans l'air et en AC (22 avril 1973)

	AIR			AC		
	pourcentage malades			pourcentage malades		
		C100	C*100		C100	C*100
<i>P. alba</i>	70,0	217	307	18,0	29,0	156,7
<i>P. malicorticis</i>	78,0	280	360	92,0	466,0	505,5

TABLEAU 2 - Cinétique de l'évolution pathogénique

		nombre moyen de lésions par fruit										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11 etc.
<i>P. alba</i>	AIR	36	33	25	19	8	6	5	3	3	2	2
	AC	29	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>P. malicorticis</i>	AIR	35	38	25	18	12	10	7	5	2	1	1
	AC	24	28	23	21	23	18	15	6	8	5	1

		nombre moyen de lésions selon leurs dimensions (classes de 5 en 5 mm)								
		< 5	5-10	10-15	15-20	20-25	25-30	30-35	35-40	> 40 etc.
<i>P. alba</i>	AIR	39	102	107	93	38	28	9	12	10
	AC	14	12	6	11	6	6	0	2	1
<i>P. malicorticis</i>	AIR	151	151	77	66	43	47	13	14	4
	AC	476	269	101	52	12	16	4	2	5

TABLEAU 3 - Teneurs en composés phénoliques en mg/100 g de poids frais, pour les leucoanthocyanes les unités sont en valeurs arbitraires (DO sans opérer de dilution pour le dosage du 27 avril) Σ = non dosable avec la technique utilisée.

Composé phénolique dosé	7 déc.		8 mars		18 mars		26 mars		27 avril	
	AC	AIR	AC	AIR	AC	AIR	AC	AIR	AC	AIR
acide chlorogénique	115	110	57,5	50,7	38,0	35,0	30,0	28,0	Σ	Σ
catéchines	448	448	358	332	185	229	256	192	96	112
leucoanthocyanes	4,80	8,32	0,92	1,04	0,96	1,12	1,00	0,84	0,21	0,22
phénols totaux	512	819	550	512	294	332	268	300	86	121

DISCUSSION

Nous avons déjà signalé l'existence, chez les pommes de trois phases (2) :

- (i) **phase réfractaire** avec impossibilité d'infection naturelle ou expérimentale, sans doute par suite des teneurs très élevées en composés phénoliques et acides organiques (10) et aussi aux réactions possibles de type phytoalexine (14).
- (ii) **phase intermédiaire** avec infection expérimentale possible bien avant la récolte sur fruits isolés, malgré des teneurs encore élevées en inhibiteurs.
- (iii) **phase de sensibilité** au cours de laquelle l'infection naturelle se développe suivant la cinétique montrée par les tableaux 1 et 2.

Notre expérimentation revient à mettre en doute le rôle exclusif des composés phénoliques comme facteurs de résis-

tance des fruits à la maladie. Nous ne pensons pas qu'un autre composé phénolique non dosé ici, puisse jouer un rôle très important ; en effet l'efficacité d'un grand nombre de composés testés *in vitro*, s'avère généralement assez faible sur les *Pezizula* (9). Le taux de phénols totaux évolue d'ailleurs de la même manière dans les deux atmosphères.

La diminution relative affecte surtout les leucoanthocyanes, l'acide chlorogénique dans une moindre mesure. Les leucoanthocyanes pourraient être le principal facteur de résistance, comme dans le cas du *Monilia fructigena* (7). La résistance nous paraît liée à plusieurs facteurs non indépendants : teneur en composés phénoliques, acidité, sensibilité de la lamelle moyenne à la lyse enzymatique. Peut-être faut-il faire intervenir les phénols oxydases probablement mieux conservées en AC. En effet les pourritures sont plus colorées et plus résistantes, ce qui semble indiquer que les phénols sont oxydés ou transformés sous l'action des

parasites, et l'on sait alors que leur toxicité est plus grande (4).

HULME et EDNEY (9) n'ont pas pu établir de rapport entre la chute des phénols totaux et l'accroissement de la sensibilité par manque d'une analyse cinétique de la maladie. Très récemment l'un de ces deux auteurs estime qu'il n'est pas possible d'évaluer l'importance des composés phénoliques dans la résistance des fruits à la pourriture (5) ; nous ne sommes donc pas de cet avis. L'analyse comparée de la fréquence dimensionnelle des lésions dans l'air et en AC, permet au contraire d'apporter quelques clartés sur ce problème.

En réalité la maladie évolue progressivement, et non soudainement, entre la phase intermédiaire et la phase de sensibilité. On peut alors décomposer le phénomène de la manière suivante :

- Les composés phénoliques peuvent à eux seuls expliquer, en présence d'un pH assez bas, la première phase de la latence, ou absence totale de lésions jusqu'au début du mois de février (d'après les dimensions des lésions).

- Ils ne peuvent pas, en revanche, expliquer l'évolution différente de la maladie dans l'air et en AC dès le moment où elle est déclenchée. En effet les teneurs en composés phénoliques dans ces conditions sont très voisines et évoluent d'une manière identique au cours du temps.

- Il faut donc à ce moment, faire intervenir d'autres mécanismes et notamment le pH nettement plus élevé dans l'air. On connaît la plus grande résistance du *P. malicorticis* à l'acidité (1) *in vitro* par rapport au *P. alba*. En outre l'acidité intervient indirectement en agissant sur l'efficacité des phénols comme fongistatiques. Certains d'entre eux étant plus actifs à un pH voisin de 3,0 plutôt que de 4,0 (9). Le pH serait donc essentiellement responsable de l'évolution pathogénique différente dans les deux atmosphères.

- Enfin il y a effondrement de tous les facteurs de résistance, taux très bas de composés phénoliques, pH supérieur à 4,0, sensibilité maximale des parois à la lyse enzymatique (2) enfin, par hypothèse, faible activité des phénols oxydases.

BIBLIOGRAPHIE

1. BOMPEIX (G.).
Rev. Mycol., 33, 4, 1969, p. 268-283.
2. BOMPEIX (G.).
Thèse doctorat ès sciences, Paris VI, 1972, 232 p.
3. BOMPEIX (G.).
Phytopath. Z., 1974 (sous presse).
4. COLE (M.).
Nature, 181, 1958, p. 1596-1597.
5. EDNEY (K.L.).
Trans. Br. Mycol. Soc., 62, 1, 1974, p. 25-34.
6. FARKAS (G.L.) et KIRALY (Z.).
Phytopath. Z., 44, 1962, p. 105-150.
7. FAWCETT (C.H.) et SPENCER (D.M.).
Ann. Appl. Biol., 61, 2, 1968, p. 245-253.
8. GOLDSTEIN (J.L.) et SWAIN (T.).
Phytochem., 2, 1963, p. 371-383.
9. HULME (A.C.) et EDNEY (K.L.).
Phenolics in plants in health and disease, 1960, Pergamon press.
10. MACHEIX (J.J.).
C.R. Acad. Sci., 264, 26, 1967, p. 3010-3013.
11. MACHEIX (J.J.).
Fruits, 1, 23, 1968, p. 13-20.
12. MLAIKI (A.).
Thèse Ing. doct., Université de Toulouse, 1970, 100 p.
13. SWAIN (T.) et HILLIS (W.E.).
J. Sci. Food Agric., 10, 1959, p. 63-68.
14. SWINBURNE (T.R.).
in: Fungal pathogenicity and the plant's response, 1973, p. 365-382, Academic press.

